

からし油の定量に於ける加水分解条件の検討

Study on the Enzymatic Hydrolysis Conditions in the Determination of Volatile Isothiocyanate in Mustard

福 沢 美喜男・碓 谷 令 子

Fukuzawa, Mikio and Ikariya, Reiko

(専任講師, 栄養学実験担当) (助手, 食品学研究室)

は じ め に

一般にカラシ粉中の volatile isothiocyanate の定量法には銀滴定法, 紫外外部吸収による比色法, ヨードメトリーなどがあるが最も広く用いられているのは銀滴定法でありわが国に於ける公定法(局法)にも銀滴定法が採用されている。しかし周知のごとく練からしの volatile isothiocyanate はカラシ粉中の sinigrin が自家 myrosinase によって加水分解を受けて生ずる二次産物であり, 加水分解の条件によっては定量値にかなりの動揺があることが推定されるが, この点に関しては局法では明確な規定がなく, Wettr 等 ('56)¹⁾ がナタネ種子の場合について至適 pH を検討しているにすぎない。

さらに myrosinase の酵素作用に対する pH, 温度などの影響については石本 ('49)²⁾, 長島 ('59)³⁾ らの研究があるが, これらは何れも glucose または KHSO_4^- の生成を指標としており, この結果を直に volatile isothiocyanate の定量条件に適用するには Virtanen ('65)⁴⁾ が指摘するような isothiocyanate の二次分解があるとすれば適当でない。

著者らは volatile isothiocyanate が水に不溶性であり, 揮散し易く, 且つ不安定なために定量前の条件が測定値に影響を与えるのではないかと考え, volatile isothiocyanate の定量における加水分解諸条件を検討したので報告する。

実 験

1) 材 料

カナダ産黒ガラシ種子 (Brassica nigra (L.) Koch.) を国内で加工調製した和ガラシ粉と称する銘柄を用いた。

2) 定量装置及び操作

Wetter¹⁾ の装置に準じて装置を作成し, 接合部はすべてすり合せにした。分解フラスコは共栓つき 500 ml 容二口フラスコを使用し, 加水分解時は密栓して isothiocyanate の揮発を防いでおく。一方受器は 500 ml の三角フラスコを使用し, 0.1 N 硝酸銀溶液 25 ml, 10% アンモニア水 10ml, 95% エタノール 50ml を加え, 冷却管の末端につけて受器を氷で冷却しておく。次に加水分解の終わったフラスコを装置にとりつけ, 95% エタノール 50ml を静かにフラスコ内に加え, 直ちに冷却管と連結管で接合させ, 一方の口から蒸気を送って蒸溜する。蒸溜時間は約45分とし溜出液が約 200ml になるまで行った。終了後受器は室温に18~20時間放置したのち湯浴上で1時間加熱し, thiourea と硝酸銀を完全に反応させ生じた硫化銀を濾過し, 濾液に指示薬として1%硫酸第二鉄アンモン 10ml, 硝酸 15ml とを加え, 残余の硝酸銀を 0.1N ロダンアンモン溶液で滴定し, allyl isothiocyanate として計算した。

3) 加水分解条件の検討

カラシ粉 5 g を精秤し, 500ml 容共栓付き二口フラスコに入れ, 緩衝液 50ml, 蒸溜水 50ml を加えてただちに以下に述べる条件で加水分解を行った。ただし時間条件の場合は緩衝液 25 ml, 蒸溜水 25ml を加えて加水分解を行い, 終了後ただちに 95% エタノール 100ml を加えて酵素力を抑制させたのち蒸溜した。

(1) 温度条件の検討: 予備試験で McIlvaine 氏緩衝液^{*}を用いて室温で3時間加水分解させ volatile isothiocyanate を測定したところ, pH 5.0 附近にややピークがみられたので, 同一条件 (pH 5.2) で, 3°C~40°C 間に於ける

volatile isothiocyanate を測定した。

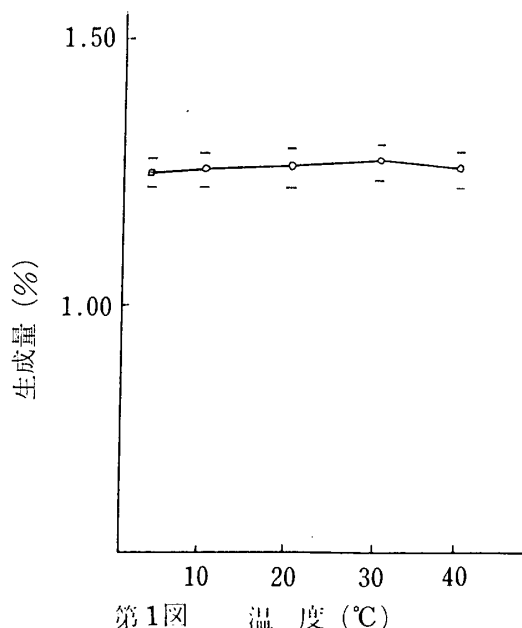
(2) 磷酸塩の阻害作用とpHについての検討：
前述の如く、石本ら¹⁾は磷酸塩が酵素作用を阻害するとしているので McIlvaine 氏緩衝液と M/5 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用いて、pH 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2について温度 30°C, 3時間の条件で加水分解を行い、磷酸塩の阻害効果と至適 pH を検討した。

* M/5 クエン酸-M/5 磷酸 2 ナトリウム緩衝液

(3) 加水分解時間の検討：Volatile isothiocyanate は不安定なために加水分解されて生成したものが一定時間後に減少することが考えられるので、温度 30°C, pH 5.2 に於いて加水分解時間 30, 60, 120, 180分 として検討した。

結果及び考察

1) 加水分解時の温度について検討した結果は第 1 図に示すように、3~10°C までの間の生成量は 30°C と比較した場合有意差を認めたが、20~40°C の変化はみられなかった。長島らは myrosinase の至適温度は 45~50°C であるとしているが、volatile isothiocyanate が揮散し易いことを考慮すれば 30°C 附近が適当であると考えられる。また 3°C 附近でも高い生成量を示しているが、Virtanen⁴⁾ も 0°C 附近で加水分解が行われ、その分解率も高いことを認めているところから、myrosinase は低温度でもその



第 1 図 温度と Volatile isothiocyanate の生成量 (P=0.05)

酵素作用はあまり抑制されないものと思われる。

2) 磷酸塩の阻害効果を酢酸緩衝液と比較して検討したが、第 1 表に示すように両緩衝液間の有意性は認められなかった。また Wetter も磷酸緩衝液を用いているところから、石本らが指摘し、成書にも記載されているような磷酸塩の阻害はないものと思われる。

第 1 表 緩衝液中の磷酸イオンが isothiocyanate の生成に及ぼす影響* (生成量は%)

P H	M/5 酢 酸 緩 衝 液	McIlvaine 緩 衝 液
3.2	1.18 ≤ 1.16 ≥ 1.14	1.19 ≤ 1.16 ≥ 1.12
4.2	1.26 ≤ 1.25 ≥ 1.24	1.26 ≤ 1.24 ≥ 1.22
5.2	1.32 ≤ 1.29 ≥ 1.26	1.31 ≤ 1.29 ≥ 1.27
6.2	1.20 ≤ 1.18 ≥ 1.16	1.19 ≤ 1.17 ≥ 1.15
7.2	1.15 ≤ 1.13 ≥ 1.11	1.14 ≤ 1.12 ≥ 1.10

* P=0.05 の水準における信頼限界

至適 pH について検討した結果、両緩衝液とも pH 5.2 が最高値を示し、pH 3.2, 4.2, 6.2, 7.2 の測定値との間に有意差を認めた。これは石本ら²⁾、長島ら³⁾の至適 pH と一致するものであるが、長島らは甚しい極大値を認めていない。この点については glucose を測定した場合と異なり、myrosinase の活力の低下のほかに、Gmerin ら ('60)⁵⁾ が報告しているように中性附近で加水分解した場合には生成された isothiocyanate に二次分解が起り、一部は SCN を遊離するとすれば、pH 6.2~7.2 の著しい減少は理解できる。Wetter¹⁾ は至適 pH は 4.0 であるとしているがこの値は信じがたい。

公定法では pH の条件は規定していないが、この方法は Gadmar ('99)⁶⁾ の方法を規準にしたものであり、当時ではその点まで規定しなかったものと思われる。

3) 生成する volatile isothiocyanate の変化を経時的に検討した結果を第 2 図に示す。加水

分解開始後 30 分間で最高値を示し、180 分までの変化には有意性が認められなかった。従って長島ら⁸⁾ が指摘している短時間での著しい減少傾向は認められなかった。

要 約

Volatile isothiocyanate を測定する場合の加水分解条件を検討した。

1) 加水分解温度に関しては 30°C を中心とした 20~40°C の範囲では有意差は認められなかった。

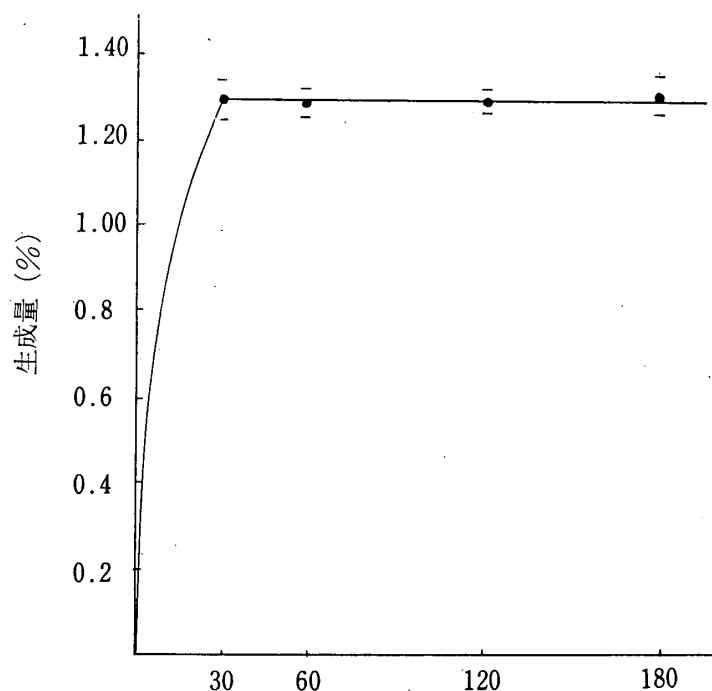
2) 磷酸塩の阻害効果を検討したが阻害作用は認められなかった。

3) 加水分解時間は 30~180 分の範囲では有意差が認められなかった。

4) 至適 PH は 5.2 附近であった。

終りに臨み、本研究について御教示と御批判を賜った本学教授箕口重義博士に、また実験とデーターの整理に協力していただいた、吉田、

阿部の両嬢に深甚の謝意を表する。



第 2 図 時 間 (分)

Volatile isothiocyanate の
経時的生成量 (P=0.05)

文 献

- 1) Wetter, L. R. : Can. J. Biochem. and Physi. **33**, 980 (1956).
- 2) 石本 真, 山科郁夫: 酵素化学シンポジウム, 第 2 集 p36 (1949).
- 3) 長島善次, 内田正昭: 農化, **33**, 484 (1959).
- 4) Virtanen A. I. : Phyto chemistry, **4**, 267 (1965).
- 5) Gmelin. R. and Vir tanen, A. I. : Acta Chem. Scand, **14**, 507 (1960).
- 6) Gadmar, J. : Archiv. Pharm., **237**, 120 (1899).
- 7) 長島善次, 内田正昭: 農化, **33**, 1144 (1959).